

2010 年度 修士論文要旨

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の鉄応答機構の解明

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 松田研究室 丹羽 めぐみ

【研究目的】海洋性珪藻は、海洋において最も繁栄している一次生産者である。しかし、興味深いことに、海域によっては主要な栄養素が豊富であるにもかかわらず、植物プランクトンの生育が悪い場所があり、これら HNLC (High-Nutrient, Low-Chlorophyll) 海域の主要制限栄養素は鉄であるとされている。鉄は要求度の高い微量金属であるため、生物は一般的に細胞外のような形態の鉄に応答する仕組みを持つが、珪藻におけるこれらの仕組みは多くが未解明である。本研究では、海洋性珪藻 *P. tricornutum* における鉄応答性遺伝子の発現制御を解析することで、海洋性珪藻の鉄応答機構の解明を目的とする。

【実験方法】鉄応答性候補遺伝子の発現解析：鉄を豊富に含む人工海水培地（F/2ASW 培地）から鉄制限培地（鉄を除いた F/2ASW 培地）に野生型 *P. tricornutum* を移植し、10 日間鉄制限培養を行った。毎日細胞を回収し、全 RNA を抽出後、これらを鋳型とし RT-PCR によって鉄応答性候補遺伝子の鉄飢餓時における mRNA 蓄積量を確認した。**鉄応答性プロモーターの単離および解析：**鉄飢餓特異的に mRNA 蓄積量が増加した *Isi1* (iron starvation induced protein), *FBP1* (ferrichrome binding protein) および *Fld* (flavodoxin) の翻訳開始点から上流部分を鉄飢餓応答性プロモーターとして単離した。その直下に *uidA* 遺伝子を連結したコンストラクトを導入したクローンについて、鉄制限培養 7 日目における GUS 活性を定量した。また、上流領域を順次削除したコンストラクトも作製し、同様に GUS 活性を定量した。**鉄シグナル伝達を担うセカンドメッセンジャーの探索：**野生型 *P. tricornutum* の鉄制限培養の際に cAMP アナログである dbcAMP (dibutyryl cAMP) を添加し、0, 3, 7, 10 日目の細胞を回収後、上記と同様に RT-PCR を行った。さらに、*Isi1* および *FBP1* プロモーターを含むクローンについて鉄制限培養 5 日目に dbcAMP を添加し、7 日目に dbcAMP を除き、0, 5, 7, 10, 12 日目の細胞を回収後、GUS 活性を定量した。また、Ca²⁺制限培地で培養した野生型 *P. tricornutum* についても、同様に RT-PCR を行った。**鉄飢餓下における野生型 *P. tricornutum* の光合成活性の測定：**鉄制限培養 10 日目の野生型 *P. tricornutum* について、酸素電極を用いて光合成パラメーターを決定した。

【実験結果と考察】鉄応答性候補遺伝子の発現解析：アレイ解析によって鉄応答性が報告されている 11 遺伝子の mRNA 蓄積量が鉄飢餓順化期特異的に増加した。このことから、これらの遺伝子は細胞内外の鉄飢餓に応答していると考えられた。**鉄応答性プロモーターの単離および解析：**予測プロモーター領域を導入したクローンでは、それぞれ顕著な鉄飢餓応答性を示した。デリーション解析の結果、*Isi1* は翻訳開始点より上流 235 bp まで、*FBP1* は上流 266 bp から 636 bp まで、*Fld* は翻訳開始点より上流 366 bp までの領域が鉄飢餓に応答して転写制御を行うために必須であると結論した。**鉄シグナル伝達を担うセカンドメッセンジャーの探索：**上記 11 遺伝子すべての鉄飢餓時における mRNA 蓄積量が dbcAMP の添加によって減少した。さらに、*Isi1* および *FBP1* プロモーター活性誘導レベルも dbcAMP の添加によって減少し、dbcAMP を除くと誘導が回復した。このことから、*P. tricornutum* において鉄シグナルは cAMP を介して伝達されていることが示唆された。また、Ca²⁺飢餓下において、いくつかの鉄応答性遺伝子の mRNA 蓄積量が鉄の存在下にも関わらず増加した。このことから、Ca²⁺も *P. tricornutum* の鉄シグナル伝達において何らかの役割を持つことが示唆された。**鉄飢餓下における野生型 *P. tricornutum* の光合成活性の測定：**鉄飢餓下で最大光合成活性および HCO₃⁻の親和性が減少した。以上の結果から、*P. tricornutum* において鉄は光合成に関与する環境シグナルの一つであり、鉄が欠乏すると各鉄応答性遺伝子の転写が誘導され、その転写調節には cAMP が関与していることが示唆された。